

Mgr inż. Adam Świergolski
Nauczyciel dyplomowany
Zespół Szkół im. Ireny Kosmowskiej
w Suszu

Referat
z technologii biopreparatów

Genetyczne doskonalenie szczepów

Doskonalenie szczepów można przeprowadzić za pomocą wielu metod modyfikacji genetycznej, do których zaliczamy między innymi:

- mutagenezę i mutacje,
- rekombinację genetyczną,
- fuzję protoplastów.

Drobnoustroje pozyskiwane ze środowiska naturalnego prowadzą procesy biosyntezy lub biotransformacji z wydajnością niewystarczającą zazwyczaj do opracowania ekonomicznego procesu technologicznego. Dzięki funkcjonowaniu mechanizmów regulacyjnych, ukształtowanych w wyniku ewolucyjnego doskonalenia procesów komórkowych, charakteryzują się one skoordynowanym i zbilansowanym metabolizmem. Dobierając warunki hodowli można częściowo zmieniać aktywność metaboliczną szczepów dzikich i uzyskiwać podwyższenie wydajności pożądanego produktu, w granicach określonych genotypem. Szczepy takie wykorzystywane są tylko w niektórych technologiach przemysłowych, najczęściej jednak otrzymuje się je poprzez poddawanie specjalnym zabiegom doskonalącym ich cechy

technologiczne. Zasadnicze zmiany metaboliczno-fizjologiczne można uzyskać w wyniku modyfikacji genotypu drobnoustrojów, a jednym z podstawowych sposobów, jakie stosowane są w tym zakresie jest mutagenizacja i selekcja mutantów o cechach korzystnych dla danego procesu. Należy jednak pamiętać, że selekcja mutantów zawsze ma charakter fenotypowy, ponieważ prowadzona jest w określonych warunkach środowiskowych, co nie gwarantuje, że szczep wyselekcjonowany z określonej populacji komórek reprezentuje jej najlepszy genotyp. Dlatego też w każdym programie mutacyjno-selekcyjnym muszą być brane pod uwagę obydwa typy zmienności biologicznej – genotypowa i fenotypowa. Wstępne testy oceny aktywności szczepów mają na celu eliminację wariantów mało przydatnych. Wyselekcjonowane do drugiego etapu mutanty poddawane są dokładniejszej charakterystyce przy zastosowaniu zróżnicowanych warunków hodowli. Dla najlepszego szczepu opracowywane są następnie optymalne warunki procesowe. Ten tryb postępowania powtarzany jest cyklicznie.

Spontaniczna zmienność mutacyjna drobnoustrojów, obejmująca również rewersję ważnych biotechnologicznie cech szczepów produkcyjnych, zmusza do ciągłej reSelekcji wariantów najbardziej przydatnych. Poważnym problemem są też spontaniczne mutacje prowadzące do utraty przez szczepy produkcyjne cech ważnych biotechnologicznie. Mogą one doprowadzić do zdominowania hodowli przez warianty niekorzystne, jeżeli te wyróżniają się wyższą od szczepu produkcyjnego szybkością wzrostu. Stwarza to poważne zagrożenie dla procesów wielodobowych oraz hodowli ciągłych. Istnieje duża liczba chemicznych czynników mutagennych (mutagenów), takich jak: kwas azotawy, iperyt gazowy, analogi zasad azotowych, związki alkilujące, barwniki akrydynowe, a także mutagenów fizycznych, jak np.: promieniowanie UV, X, gamma, prędkie neutrony. Czynniki te zwiększają częstotliwość powstawania mutacji od kilku do kilkudziesięciu tysięcy razy. Różne mutageny wywołują odmienne rodzaje mutacji. Promieniowanie UV powoduje głównie dimeryzację zasad pirymidynowych, promieniowanie jonizujące – rozrywanie łańcuchów DNA i aberracje chromosomalne, kwas azotawy jest czynnikiem dezaminującym zasady azotowe, a N-metylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyna

(MNNG) jest czynnikiem metylującym. Wiele środków mutagennych może wywoływać kilka rodzajów uszkodzeń w strukturze DNA, np.: w wyniku działania promieniowania UV zachodzi dodatkowo hydroksylacja zasad pirymidynowych oraz sieciowanie dwuniciowego DNA. Ponieważ najczęściej nieznana jest zależność pomiędzy rodzajem mutacji na poziomie molekularnym a typem powstających mutantów, klasyczna mutagenizacja stanowi typowe postępowanie losowe, a ostateczny jej wynik nie jest możliwy do przewidzenia. Decyduje to o celowości stosowania wielokrotnej mutagenizacji i różnych mutagenów, które mogą wywoływać odmienne skutki oraz o konieczności szukania mutantów korzystnych wśród bardzo dużej liczby izolatorów. Do najczęściej stosowanych mutagenów należą: promieniowanie UV oraz MNNG.

Ważną kwestię stanowią dawki mutagenu. Zbyt duże dawki mutagenów powodują zwykle powstawanie wielu uszkodzeń równocześnie w różnych miejscach genomu. Zwiększa się w tych warunkach prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji niekorzystnych, maskujących ewentualne mutacje pożądane. Celowe jest zatem stworzenie takich warunków mutagenizacji (mała dawka mutagenu), aby selekcjonowane szczepy charakteryzowały się pojedynczymi mutacjami. Jeżeli dawka mutagenu jest duża, wówczas zmiany w DNA mogą być tak znaczne, że enzymy naprawcze nie są w stanie ich wyeliminować, co prowadzi do śmierci komórki. Efektem letalnym może również zakończyć się mutacja w wypadku braku mechanizmów naprawczych w komórce, wyeliminowanych np.: na skutek innej, wcześniejszej mutacji.

Formą materiału biologicznego najbardziej dogodną do przeprowadzania mutagenizacji są pojedyncze, jednojądrowe komórki haploidalne. Efektywność procesu mutagenizacji zależy nie tylko od rodzaju użytego czynnika, lecz również od tego, z jakiej fazy hodowli pochodzą komórki. Mutageny reagujące z DNA, np. kwas azotawy, odczynniki alkilujące oraz promieniowanie UV, mogą być stosowane zarówno wobec komórek spoczynkowych, jak i aktywnie namnażających się. Podatność szczepu na mutagenezę może kształtować się odmiennie w odniesieniu do mutacji spontanicznych i indukowanych. Najbardziej korzystny jest układ, w którym szczep wykazuje dużą podatność

na mutagenezę indukowaną (co pozwala na jego ulepszenie), a równocześnie jest mało podatny na powstawanie mutacji samorzutnych, co warunkuje jego dużą stabilność genetyczną.

Rekombinacja genetyczna, definiowana jako proces, w wyniku którego powstają nowe kombinacje genów, stanowi podstawę bardziej racjonalnego od mutagenizacji sposobu otrzymywania szczepów do celów biotechnologicznych. Jest przeprowadzana w dwojaki sposób: poprzez hybrydyzację, czyli krzyżowanie szczepów oraz przez konstruowanie sztucznych kombinacji genów *in vitro* i uzyskiwanie ekspresji dokładnie zaprogramowanej informacji genetycznej w komórkach odpowiednio dobranego gospodarza.

Naturalna hybrydyzacja wiąże się z przekazaniem informacji genetycznej z komórki dawcy do biorcy w wyniku przedłużonego kontaktu (koniugacji) obu komórek i polega na wymianie odcinków DNA (rekombinacji) między chromosomami lub genoforami dawcy i biorcy w procesie określanym jako *crossing over*. W wyniku zachodzącej następnie segregacji, czyli rozdzielenia materiału genetycznego w komórkach potomnych, można otrzymać hybrydy (rekombinanty, segreganty) o zmienionym genotypie i nowych właściwościach metabolicznych. Jedną z koncepcji wykorzystania procesu hybrydyzacji drobnoustrojów do ich ulepszenia było pozyskiwanie nowego wartościowego materiału genetycznego ze środowisk naturalnych i użycie go do wzbogacania genotypów obecnie stosowanych, upośledzonych genetycznie szczepów produkcyjnych. Zasadniczym dążeniem stało się krzyżowanie szczepów pochodzących z różnych linii mutacyjno-selekcyjnych, zwłaszcza wywodzących się od różnych przodków. Łącząc cechy korzystne można wówczas eliminować jednocześnie cechy niepożądane.

Do konstruowania nowych szczepów bakterii przy użyciu plazmidów (transformacja) i fagów (transfekcja) jako nośników (wektorów) genów wprowadzanych do wybranych komórek biorcy zostały wykorzystane: koniugacja i transdukcja. Podczas koniugacji, zachodzącej u *Prokaryota*, komórki przeciwnych typów płciowych, np. F⁺ i F⁻ u *E. coli*, mogą przekazywać

DNA między sobą (z F⁺ do F⁻) dzięki plazmidom płodności. Po zakończeniu koniugacji następuje włączenie DNA dawcy do genomu biorcy.

Natomiast klasyczne manipulacje genetyczne wykonywane jedynie w komórkach bakterii, polegające na wyodrębnianiu genów (tj. małych fragmentów DNA) i ich przenoszeniu z jednej komórki do drugiej (w ramach tego samego gatunku) przy udziale łagodnych (umiarkowanych) fagów jako wirusów bakteryjnych – nazwano transdukcją. Lizogenia bakterii, pokrewna transdukcji, polega na wbudowaniu (w wyniku *crossing over*) fagu zjadliwego (wirulentnego, np. T4) do genomu zakażonej bakterii, po czym ma miejsce jego lityczny cykl życiowy, w wyniku którego komórki bakteryjne ulegają masowej lizie. Proces rekombinacji DNA *in vitro* obejmuje podstawowe techniki wyodrębniania i zmiany cząsteczki DNA, tj. łączenia natywnych fragmentów DNA ze skonstruowanymi sztucznie fragmentami (wektorami lub z tzw. kasetami ekspresyjnymi), a następnie amplifikacji (powielania) pożądanego genu w transformowanej komórce. Przenoszenie wektora (z fragmentem pożądanego genu) z jednego organizmu do drugiego i jego powielanie w komórce gospodarza nazwano klonowaniem (rys. 1).

Prokariotyczny DNA można klonować bezpośrednio, natomiast DNA eukariotyczny może być sklonowany tylko jako cDNA (*circular DNA*).

Pierwszym etapem w rekombinacji *in vitro* jest wydzielanie odpowiedniego DNA, następnie jego oczyszczanie i fragmentowanie do poszczególnych genów za pomocą specyficznych enzymów restrykcyjnych (tnących), bądź ultradźwięków. Drugim etapem w rekombinacji *in vitro* jest łączenie odpowiednich fragmentów DNA z cząsteczkami wektorowymi z udziałem enzymu ligazy DNA, wytwarzającej wiązania fosfodiesterowe, przy czym wektory są to niewielkie fragmenty DNA mające zdolność do samodzielnej replikacji w komórce.

Tak zrekombinowany fragment DNA z wektorem, po wprowadzeniu do komórki biorcy za pomocą transformacji (bakterii) lub transfekcji (komórek eukariotycznych lub prokariotycznych przy wprowadzaniu bakteriofagów), podlega powielaniu tj. klonowaniu. Znajomość sekwencji wielu genów umożliwia przeprowadzenie różnych manipulacji genetycznych nie tylko w naturalnych genach wyizolowanych z organizmów, lecz także w DNA, które może być zsyntetyzowane chemicznie lub enzymatycznie w automatycznie sterowanym procesie. Istnieją bowiem urządzenia do otrzymywania oligonukleotydów o określonej sekwencji i długości (najczęściej 20-40 nukleotydów), z których, za pomocą ligazy DNA, konstruuje się dłuższe fragmenty DNA lub kompletne geny. Podczas enzymatycznej syntezy cDNA zawiera jedynie sekwencje kodujące. Matrycę stanowi najczęściej mRNA, które jest transkrybowane na DNA za pomocą polimerazy DNA, zależnej od RNA (tzw. odwrotnej transkryptazy).

Bardzo użyteczną w rekombinacji genetycznej *in vitro* jest metoda PCR (od ang. *Polymerase Chain Reaction*), tj. reakcja łańcuchowa polimerazy umożliwiająca selektywną amplifikację *in vitro* poszczególnych fragmentów DNA (bez jego klonowania), naśladując zjawisko replikacji *in vivo*. Do przeprowadzenia tej reakcji są potrzebne minimalne ilości (50 ng) wzorcowego jednoniciowego DNA, dwa startery (ang. *primers*) jako sondy, tj. syntetyczne oligodeoksynukleotydowe sekwencje długości ok. 20 nukleotydów, komplementarne do znanych sekwencji końcowych wzorcowego

(matrycowego) DNA, deoksynukleinowe trifosforany (dNTPs) oraz polimeraza DNA. Całość ww. materiału jest zawieszona w buforze zawierającym Mg^{2+} , jednowartościowe kationy i pewne substancje stabilizujące enzymy. Reakcja łańcuchowa polimerazy, np. Tag, polega na przeprowadzeniu wielu cykli (20-30) w ciągu 2-3 h, przy czym jeden cykl trwa od kilkudziesięciu sekund do kilkunastu minut, w zależności od potrzeby. Proces przebiega w mieszaninie o objętości nie przekraczającej 50-100 μ l, w jednej probówce Eppendorfa umieszczonej w bloku zautomatyzowanej aparatury. Każdy cykl obejmuje trzy etapy tj.:

- termiczną denaturację (w temp. 92-96°C) dsDNA do ssDNA,
- przyłączanie starterów (tworzenie wiązań wodorowych) do wzorcowego ssDNA (w temp. 40-60°C), czyli renaturację,
- wydłużanie (polimeryzacja) DNA przy końcach 3'OH w temp. 72°C w wyniku sukcesywnego przyłączania dNTPs za pomocą termostabilnej polimerazy DNA.

Metoda PCR stosowana obecnie w wielu wersjach metodycznych znalazła powszechne zastosowanie nie tylko w laboratoriach genetycznych do prac badawczych, lecz również w diagnostyce drobnoustrojów.

Do grupy nowych metod genetycznych, służących otrzymaniu kultur drobnoustrojów i organizmów wyższych o korzystniejszych cechach biologicznych i przemysłowych, należy zaliczyć indukowaną fuzję komórkową protoplastów, tzn. hybrydyzację somatyczną i powstawanie mieszańców genetycznych przy rekombinacji.

Fuzja komórkowa, zachodząca w wyniku zlewania się błon komórkowych, jest zjawiskiem występującym w przyrodzie spontanicznie, jednakże z niską częstotliwością, uwarunkowanym obecnością odpowiednich receptorów błonowych. Główną przeszkodą fizyczną w plazmogamii jest sztywna ściana komórkowa. Stanowi ona również barierę niezgodności w odniesieniu do możliwości fuzji komórek różnych gatunków. Trudności te zostały przezwyciężone po opracowaniu technik otrzymywania i fuzji protoplastów, dzięki czemu powstała możliwość praktycznego wykorzystania rekombinacji w ulepszaniu szczepów przemysłowych.

Kariogamia i rekombinacja może zachodzić z częstością nawet 10-20% w stosunku do liczby komórek, które uległy fuzji. Umożliwia to selekcję rekombinantów bez konieczności używania szczepów wyjściowych, znakowanych markerami auksotroficznymi.

Następne zalety i możliwości, jakie stwarza protoplastyzacja, to:

- fuzja i rekombinacja pomiędzy szczepami o tym samym typie płciowym,
- rekombinacja międzygatunkowa,
- rekombinacja pomiędzy więcej niż dwoma genotypami rodzicielskimi w pojedynczym doświadczeniu,
- wymiana dużych fragmentów DNA, przy czym każdy z genotypów rodzicielskich może odegrać zarówno rolę dawcy, jak i biorcy,
- ułatwiona transformacja plazmidowym DNA i transfekcja fagowa,
- możliwość fuzji protoplastów z liposomami zawierającymi obcy materiał genetyczny,
- możliwość fuzji z organelami komórkowymi, np.: mitochondriami.

Ponadto protoplasty znajdują zastosowanie w badaniach nad lokalizacją enzymów w komórce, wydzielaniem białek poza komórkę, syntezy ściany komórkowej oraz działaniem antybiotyków, substancji powierzchniowo czynnych i czynników chemicznych na komórkę.

Dzięki indukowanej i kontrolowanej fuzji komórkowej istnieje możliwość wprowadzenia nowych genów z większą częstotliwością, nawet do komórek niezdolnych do spontanicznego łączenia się bądź do komórek odległych gatunkowo, co stwarza perspektywy dla biotechnologów do dalszych prac nad zmianami genotypu i fenotypu organizmów przemysłowych.

Do otrzymania hybrydów somatycznych stosuje się następujące rodzaje fuzji:

- chemiczną, tj. wirowanie protoplastów przy wysokim pH, głównie z glikolem polietylenowym (PEG) i jonami wapnia,
- biologiczną, w wyniku działania inaktywowanego wirusa Sendai,
- fizyczną, z zastosowaniem gradientu osmotycznego oraz pod wpływem działania pól elektrycznych o odpowiednio wysokim natężeniu (tzw. elektrofuzja).

Właściwe wykorzystanie w przemyśle nowych szczepów drobnoustrojów, otrzymanych metodami inżynierii genetycznej, zależy przede wszystkim od możliwości zachowania stabilności ich cech biotechnologicznych, uwarunkowanych genotypem oraz fenotypem. Niestabilność właściwości komórki może wynikać z tytułu segregacji (eliminacji) lub utraty transformowanych genów, jak też ze zmiany liczby oraz struktury chromosomów.

W celu zachowania określonych właściwości biotechnologicznych drobnoustrojów, szczególną uwagę zwraca się na opracowywanie metod stabilizacji przechowywanego materiału genetycznego oraz specyficznych i w miarę szybkich metod selekcji szczepów stosowanych w procesach biotechnologicznych. W chwili obecnej biotechnologia żywności w dużym stopniu korzysta z faktu poznania i możliwości poprawy funkcji genetycznych drobnoustrojów. Nowe trendy w biotechnologii kreują efektywniejsze sposoby wytwarzania żywności, jak również wyraźnie poprawiają jej jakość i atrakcyjność, optymalizując przy tym parametry ekonomiczne procesu produkcyjnego.

Literatura

1. Bednarski W., Rejs A.: Biotechnologia żywności. WNT, Warszawa, 2001.
2. Chmiel A.: Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. PWN, Warszawa, 1994.